

外源性 NO 预防大鼠应激性胃黏膜损伤中胃运动的作用

王福文, 李杰, 胡志力, 解砚英

王福文, 李杰, 胡志力, 解砚英, 山东省医学科学院药物研究所药理研究室 山东省济南市 250062
山东省医学科学院青年基金资助项目, No. 9904
项目负责人: 王福文, 250062, 山东省济南市经十路 89 号, 山东省医学科学院药物研究所药理研究室. wangfuwww@163.net ■
电话: 0531-2919972 传真: 0531-2612443
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

摘要

目的: 研究胃运动在一氧化氮(NO)供体硝普钠预防大鼠胃黏膜损伤中的作用。

方法: 采用浸水束缚应激法建立大鼠应激性胃溃疡模型. 气囊法记录胃运动, 比色法测定血清和胃黏膜组织中 NO 含量, 并观察胃黏膜组织病理学变化。

结果: 硝普钠可以明显减轻浸水应激引起的胃黏膜损伤; 抑制胃运动亢进, 尤其是降低胃运动指数、收缩时间百分比和高强度收缩次数; 同时增加血清和胃黏膜中 NO 含量; 胃黏膜病理损害程度显著减轻。

结论: 外源性 NO 对浸水应激性胃黏膜损伤的保护作用可能是通过抑制胃运动亢进和增加胃黏膜 NO 含量来共同实现的。

王福文, 李杰, 胡志力, 解砚英. 外源性 NO 预防大鼠应激性胃黏膜损伤中胃运动的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(12):2036-2038
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/2036.asp>

0 引言

应激性胃黏膜损伤是一种临床上较常见的急症, 其发病率占危重患者的 80% 以上, 由其引起胃肠道出血而导致患者死亡的比例有升高的趋势, 死亡率达 40-60% 或更高. 目前, 其发生机制仍是医学领域的一个重要研究方面. 大多数研究者认为胃黏膜血流量减少是其重要原因^[1-5], 而关于胃运动在其中作用的研究尚不多^[6-8]. 为此, 本实验观察了胃运动在 NO 供体硝普钠防治大鼠应激性胃黏膜损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 硝普钠, 北京制药工业研究所实验药厂, 批号 990202. L- 硝基精氨酸(L-NNA), Sigma 公司, 批号 218-418-9. NO 试剂盒, 批号 20020909, 南京建成工业研究院提供. 氯化钠注射液, 济南三九益民制药有限公司, 批号 2000042104-05-02. Wistar ♂ 大鼠 70 只, 体质量 220-270 g, 由山东大学实验动物中心提供, 合格证编号: 鲁动质字 200002002 号. LMS-2B 型二道生理记录仪, 成都仪器厂. 722 分光光度计, 上海第三分析仪器厂。

1.2 方法 将动物随机分为 5 组, 即单纯束缚组, 溃疡模型组, L-NNA 组(30 mg/kg), 硝普钠大剂量组(200 μg/kg), 小剂量组(100 μg/kg), 每组 14 只. ip 给药. 给药时间为浸水束缚应激前 20 min. 给药体积为 2 mL/200 g.

1.2.1 应激性胃黏膜损伤模型的制备 根据 Murakami et al^[9] 介绍的方法制备. 将动物浸水(水温 20 ± 1°C)应激 4 h 后处死, 按照 Guth et al^[10] 法判断损伤分数。

1.2.2 胃运动的记录 参考 Mersereau et al^[11] 法用自制气囊记录胃运动. 动物浸水 1 h 后开始连续记录胃运动 3 h. 将高度大于或等于 4 mm, 宽度大于 4 s 的波定为胃收缩波, 以区别由于动物挣扎腹内压升高而引起的胃内压升高所记录到的波^[6]. 观察收缩频率、收缩幅度、收缩宽度、每分运动指数、胃收缩时间百分比、高强度收缩次数的变化。

1.2.3 血清和胃黏膜中 NO 含量的测定 分别于应激前、应激 4 h 后取血 2.0 mL, 离心, 得血清; 同时处死动物, 取胃, 剥离胃黏膜 100 mg, 用生理盐水稀释 10 倍, 研磨, 取上清液. 采用常规 Gress 法测定 NO 含量。

1.2.4 胃黏膜组织病理学检查 各组分别随机取 4 只大鼠于近大弯侧的胃黏膜组织 1 × 1 cm, 按常规法制成标本, 进行扫描电镜和透射电镜观察。

统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示和组间 t 检验, P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜损伤程度 大鼠浸水应激 4 h, 可以引起胃黏膜严重损伤(P < 0.01). L-NNA 由于阻断了体内内源性 NO 的进一步合成, 胃黏膜损伤更为严重. 硝普钠则明显减轻胃黏膜损伤, 与溃疡模型组比较皆有显著性差异(P < 0.05)(表 1)。

表 1 硝普钠对大鼠应激性胃黏膜损伤的影响($\bar{x} \pm s$, n=14)

组别	剂量(μg/kg)	胃黏膜损伤指数
单纯束缚组	-	0.40 ± 0.70
溃疡模型组	-	36.60 ± 6.36 ^a
L-NNA	30 000	39.70 ± 4.76 ^a
NO	200	22.40 ± 5.40 ^b
	100	24.30 ± 4.30 ^b

^aP < 0.01 vs 单纯束缚组; ^bP < 0.05 vs 溃疡模型组。

2.2 各组大鼠胃运动变化 大鼠浸水束缚应激 4 h 后, 胃运动各项指标均明显增加(P < 0.01), L-NNA 组胃运

动变化同胃溃疡模型组. 硝普钠则明显降低浸水应激引起的胃运动收缩幅度、收缩宽度、每分运动指数的增加, 明显缩短收缩时间百分比, 减少高强度收缩次数 ($P < 0.05$) (表 2).

表 2 硝普钠对大鼠胃运动的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$)

组别	剂量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	收缩频率 (次/min)	收缩幅度 (mm)	收缩宽度 (s)	运动指数 (mm.s/min)	收缩时间 百分比(%)	高强度收缩 次数(次/3 h)
单纯束缚组	-	0.39 ± 0.11	11.03 ± 4.30	16.24 ± 8.89	218.26 ± 38.31	16.91 ± 9.22	0
溃疡模型组	-	1.24 ± 0.30^b	16.26 ± 4.60^a	35.63 ± 8.29^b	782.23 ± 80.79^b	70.65 ± 12.32^b	29.30 ± 20.24^b
L-NNA	30 000	1.19 ± 0.51^b	16.43 ± 6.70^a	34.95 ± 9.34^b	747.57 ± 213.58^b	68.93 ± 14.33^b	28.70 ± 17.53^b
NO	2 00	0.93 ± 0.44	8.75 ± 4.36^d	26.04 ± 7.30^c	250.71 ± 67.80^d	39.67 ± 20.71^d	6.10 ± 10.21^d
	100	0.98 ± 0.37	10.18 ± 3.75^d	25.34 ± 11.69^c	285.60 ± 02.41^d	46.22 ± 13.63^d	9.50 ± 13.13^a

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.01$ vs 单纯束缚组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 溃疡模型组.

表 3 硝普钠对大鼠血清和胃黏膜 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	血清 NO ($\mu\text{mol}/\text{L}$)		胃黏膜 NO ($\mu\text{mol}/\text{g}$ 蛋白)
		应激前	应激 4 h	应激 4 h
单纯束缚组	-	29.54 ± 8.78	28.17 ± 3.85	24.38 ± 4.90
溃疡模型组	-	30.30 ± 15.45	39.64 ± 13.80^a	16.55 ± 7.04^b
L-NNA	30 000	30.15 ± 7.32	35.49 ± 20.60	12.09 ± 2.66^b
NO	200	28.63 ± 9.83	70.61 ± 29.54^c	35.45 ± 12.20^c
	100	30.28 ± 13.65	67.26 ± 26.80^c	30.68 ± 8.47^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 单纯束缚组; ^c $P < 0.01$ vs 溃疡模型组.

2.4 胃黏膜的扫描电镜观察 单纯束缚组大鼠胃黏膜表面稍呈波浪状, 胃黏膜上皮饱满, 排列整齐有序, 可见到胃小凹. 溃疡模型组胃黏膜上皮细胞破坏严重, 呈空泡状或碎片状溃烂, 脱落, 细胞界限不清. L-NNA 组胃黏膜改变同溃疡模型组. 硝普钠组胃黏膜上皮拥挤, 部分细胞表面出现片状不规则的缺损, 少数细胞呈破碎状.

2.5 胃黏膜的透射电镜观察 单纯束缚组大鼠胃黏膜上皮结构完整, 细胞连接紧密, 线粒体结构正常. 溃疡模型组胃黏膜上皮结构不完整, 细胞间隙增大, 线粒体嵴断裂, 肿胀, 空泡化. L-NNA 组胃黏膜改变同溃疡模型组. 硝普钠组胃黏膜上皮细胞间隙稍增大, 线粒体轻度肿胀, 轻度空泡化, 血管内充血减轻.

3 讨论

应激性胃溃疡是机体在多种危重紧急情况下发生的急性应激性胃黏膜病变, 可以加速危重患者死亡, 因此研究应激性胃黏膜损伤发生、发展机制, 寻找有效的防治措施成为基础医学和临床医学亟需解决的问题.

NO 作为一种新型的细胞第二信使或效应分子, 在应激性胃黏膜损伤中起着非常重要的作用^[12, 13]. 有实验证明 NO 在多种实验条件下, 可维持胃黏膜完整性, 对胃黏膜具有很强的保护作用^[14]. 本实验结果表明, 浸水束缚应激可以引起严重的胃黏膜损伤, 使血清 NO 含量

2.3 各组大鼠血清和胃黏膜 NO 含量 大鼠浸水束缚应激 4 h 可使血清 NO 含量明显增加, 胃黏膜 NO 含量明显降低. L-NNA 则使血清和胃黏膜 NO 含量进一步减少. 硝普钠则明显增加血清和胃黏膜中的 NO 含量 (表 3).

明显增加, 胃黏膜 NO 含量明显减少; 预先使用 NOS 抑制剂 L-NNA 可明显加重浸水束缚应激所致的胃黏膜损伤, 使胃黏膜 NO 含量进一步减少. 而预先给予 NO 供体硝普钠则明显减轻这种损伤, 使胃黏膜 NO 含量明显增加, 血清 NO 含量也随之增多.

近几年来, 有证据表明, 动物在应激过程中, 胃的运动机能发生很大的变化. 艾洪滨和 Garrick et al^[6, 8] 报道大鼠浸水应激后, 胃运动机能加强, 这和我们的实验结果一致. 硝普钠预处理则使胃运动机能明显减弱, 高强度收缩次数明显减少, 胃收缩时间明显缩短, 胃黏膜损伤明显减轻. 说明胃运动亢进在浸水应激引起胃黏膜损伤的过程中起着主要原因^[15]. 其组织形态学表明: 肉眼可见的点状或条索状损伤, 大多位于黏膜皱折处, 且多与胃的纵轴平行. 由于沿黏膜皱折基底部的损伤是由坏死的黏膜组织形成的, 该损伤可能是由于胃运动亢进而导致胃黏膜长时间处于强烈收缩状态, 黏膜间相互摩擦, 从而不断地压迫黏膜皱折部位, 影响了黏膜局部区域的血液循环, 使受压迫较重的黏膜皱折处局部血流低灌注和低氧^[16], 造成胃黏膜血流量下降, 细胞能量代谢率下降, 抵抗力减弱, 再加之黏液减少, 屏障机能降低, 从而使胃黏膜在胃酸、胃蛋白酶、ET、氧自由基等攻击因子的共同作用下导致胃黏膜缺血、缺氧, 产生溃疡、糜烂, 甚至出血.

总之, 我们认为: 胃运动亢进是应激性胃黏膜损伤的动力和主要原因. NO 供体硝普钠则是通过抑制胃运动亢进, 升高胃黏膜 NO 水平, 有效地舒张胃黏膜血管, 增加局部黏膜血流量, 防御胃内容物对胃黏膜的理化刺激和损害, 从而达到防治胃黏膜损伤的目的. 至于 NO 是通过什么机制来抑制胃运动, 有待进一步探讨.

4 参考文献

- 1 张在兴, 才文彦, 祝学光. 一氧化氮与急性胃黏膜病变. 国外医学生理、病理科学与临床分册 1997;17:61-63
- 2 Sato N, Kawano S, Tsuji S, Ogihara T, Yamada S. Gastric blood flow in ulcer disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995; 208:14-20

- 3 Milier TA. Mechanisms of stress-related mucosal damage. *Am J Med* 1987;83:8-14
- 4 Miyoshi M, Kasahara E, Park AM, Hiramoto K, Minamiyama Y, Takemura S, Sato EF, Inoue M. Dietary nitrate inhibits stress-induced gastric mucosal injury in the rat. *Free Radic Res* 2003; 37:85-90
- 5 楼继军, 晏才杰, 陈华, 孙贵银, 史杰. 生长抑素和胃黏膜血流量与应激性溃疡的关系. *前卫医药杂志* 1995;12:289-290
- 6 艾洪滨, 张震东. 大鼠浸水应激性胃黏膜损伤机制的研究. *生理学报* 1990;42:496-502
- 7 艾洪滨, 张震东. 胃运动在应激性溃疡发生机制中的作用. *生理科学进展* 1991;22:276-278
- 8 Garrick T, Buack S, Bass P. Gastric motility is a major factor in cold restraint-induced lesion formation in rats. *Am J Physiol* 1986;250(2 Pt 1):G191-G199
- 9 Murakami M, Fujisaki H, Oketani K, Wakabayashi T. Effects of secretin on stress-induced gastric bleeding in rats. *Dig Dis Sci* 1985;30:346-352
- 10 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979;76:88-89
- 11 Mersereau WA, Hinckley EJ. Hypothermia-induced gastric hypercontractility in the genesis of the restraint ulcer. *Can J Surg* 1981;24:622-625
- 12 马俊江, 李圣爱. 一氧化氮与胃溃疡. *生理科学进展* 1998;29:260-263
- 13 李霓, 李伟. 一氧化氮与胃黏膜保护. *新消化病学杂志* 1997;5: 57-58
- 14 张在兴, 才文彦, 祝学光, 黎家庆. 一氧化氮的胃黏膜保护作用. *中华实验外科杂志* 1997;14:240-241
- 15 Ito M, Shichijo K, Sekine I. Gastric motility and ischemic changes in occurrence of linear ulcer formation induced by restraint-water immersion stress in rat. *Gastroenterol Jpn* 1993; 28:367-373
- 16 Tarnasky PR, Livingston EH, Jacobs KM, Zimmerman BJ, Guth PH, Garrick TR. Role of oxyradicals in cold water immersion restraint-induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig Dis Sci* 1990;35:173-177

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

热盐水致胃黏膜细胞凋亡及对热休克蛋白表达影响

张 沥, 张玲霞, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周

张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周, 西安市中心医院消化科 陕西省西安市 710003

项目负责人: 张沥, 710003, 陕西省西安市后宰门 185 号, 西安市中心医院消化科.

电话: 029-7268355-3061

收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-04

摘要

目的: 研究热盐水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎(CAG)胃黏膜组织中的凋亡细胞、增生细胞和 Bcl-2、Fas、HSP60、HSP70、HSP90 α 及 P53 表达状态, 以探讨 CAG 发病机制及长期热咸饮食与慢性萎缩性胃炎发生的关系。

方法: 采用脱氧核糖核酸转移酶介导等缺口末端标记(TUNEL)技术及免疫组织化学染色技术. 细胞凋亡时DNA含量分析采用流式细胞检测技术.

结果: TUNEL检测细胞凋亡显示: 在热盐水所致的大鼠萎缩性胃炎中凋亡细胞数明显增多, 在黏膜全层均可见到, 呈弥漫性分布. 萎缩性胃炎中凋亡细胞指数显著高于正常大鼠胃黏膜(P < 0.05); 免疫组化法检测凋亡相关基因和PCNA, 显示: Bcl-2、Fas、HSP60、HSP70、HSP90 α 、P53及PCNA在热盐水灌胃所致的萎缩性胃炎中的表达率显著高于正常胃黏膜(P < 0.05); 流式细胞检测显示: 在萎缩性胃炎时, 在G0/G1峰前可见一个亚G0/G1峰, 也即凋亡细胞峰出现, 而在正常胃黏膜时未显示亚G0/G1峰.

结论: 热盐水灌胃可导致大鼠胃黏膜组织细胞增生和细胞凋亡异常, 其调控基因(Bcl-2、Fas)及HSP60、HSP70、

HSP90 α 、P53在热盐水所致的大鼠萎缩性胃炎发生中起重要作用。

张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周. 热盐水致胃黏膜细胞凋亡及对热休克蛋白表达影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(12):2038-2040

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/2038.asp>

0 引言

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡的过程, 是程序性细胞死亡的主要形式. 正常情况下, 细胞凋亡与细胞增生保持着一定的生长规律, 当细胞正常增生和分化被扰乱, 导致细胞过度增生和凋亡异常时, 就会诱发疾病的发生. 热休克蛋白(HSP)与细胞的转化和恶变过程密切相关, HSP通过调控细胞周期所必需的蛋白构象参与细胞的增生和死亡过程. 本研究采用脱氧核糖核酸转移酶介导等缺口末端标记(TUNEL)技术、流式细胞检测技术及免疫组织化学染色技术对热盐水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎胃黏膜上皮组织中的凋亡细胞、增生细胞和 Bcl-2、Fas、HSP60、HSP70、HSP90 表达状态进行观察, 以探讨他们在热盐水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎发生中所起的作用, 探讨食物的温度及咸度造成胃黏膜萎缩的原因, 为预防胃癌前病变和胃癌的发生提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 100只7周龄健康、性成熟的 δ SD大鼠, 体